



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA**

Efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* y clotrimazol sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol, in vitro

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Médico Cirujano

AUTORA:

León Cabanillas, Katty Vanessa (ORCID: 0000-0002-4957-7957)

ASESORES:

Dra. Goicochea Ríos, Evelyn (ORCID: 0000-0001-9994-9184)

Mg. Blgo. Polo Gamboa, Jaime (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades infecciosas y transmisibles

TRUJILLO – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mi madre, Carmen Cabanillas, por ser la luz que siempre guía mi camino, la que siempre sostuvo mi mano en momentos de tristeza y alegría, el impulso constante para lograr culminar esta larga travesía, pero sobre todo, ser el amor hecho persona.
Mi gran compañera.

AGRADECIMIENTO

A mis padres, por el amor y todos los valores que me inculcaron desde pequeña.

A Patty, Ana y Tony, mis hermanos, por el gran apoyo que me brindan en todo momento. Este logro también es vuestro.

A mis maestros, por todo el conocimiento compartido, su guía permanente y el espíritu de superación que siempre nos brindaron durante estos 7 años.

A los mejores amigos que me brindó esta hermosa carrera, Micaela, Rosa y Max, porque su apoyo y lucha constante fue determinante para que todos logremos terminar esta hermosa etapa de formación.

Índice de contenido

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	MARCO TEÓRICO	12
III.	METODOLOGÍA	17
	3.1. Tipo y diseño de investigación	17
	3.2. Variables y operacionalización	17
	3.3. Población, muestra y muestreo	18
	3.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos	19
	3.5. Procedimiento	19
	3.6. Método de análisis de datos	20
	3.7. Aspectos éticos	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
V.	CONCLUSIÓN	29
VI.	RECOMENDACIONES	30
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	ANEXOS	36

Índice de tablas

TABLA N° 1: EFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO	21
TABLA N° 2: ANOVA DE LAS MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN	23
TABLA N° 3: PRUEBA DE TUKEY	24

Índice de gráficos y figuras

FIGURA N° 1:	EFFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO
---------------------	---

22

RESUMEN

La finalidad de esta investigación es determinar el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* y clotrimazol a 50ug sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

El presente trabajo de investigación es de tipo aplicado, experimental con repeticiones múltiples, post prueba, dentro de la línea de investigación de enfermedades infecciosas y transmisibles. La población estuvo compuesta por las cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol, de las cuales, fueron incluidas las placas con cultivos puros y con 24 horas de haber sido cultivadas. Para el efecto antifúngico se utilizó el aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% y clotrimazol a 50ug, a través del método de disco difusión en agar, para luego de 24 horas medir las zonas de inhibición obtenidas de los antifúngicos. Los datos se recolectaron en una ficha de elaboración propia. Se obtuvo como resultado que sí existe sinergia antifúngica entre el aceite esencial *Calendula officinalis* y clotrimazol a 50ug sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol, siendo el halo inhibitorio mayor al que presentó el clotrimazol solo.

Palabras clave: *Calendula officinalis*, *Candida albicans*, Clotrimazol, aceite esencial.

ABSTRACT

The purpose of this research is to determine the synergistic anti-fungal effect of *Calendula officinalis* and clotrimazole essential oil at 50ug on fluconazole-resistant *Candida albicans*.

The present research work is of applied type, experimental with multiple repetitions, post test, within the line of research of infectious and transmissible diseases. The population was composed by the strains of *Candida albicans* resistant to fluconazole, from which, there were included the plates with pure cultures and with 24 hours of having been cultivated. For the antifungal effect, it was used the essential oil of *Calendula officinalis* at 100% and clotrimazole at 50ug, through the agar diffusion disc method, so that after 24 hours, the inhibition zones obtained from the antifungals were measured. The data were collected in an own elaboration card. It was obtained as a result that there is synergy between the essential oil *Calendula officinalis* and clotrimazole at 50ug on *Candida albicans* resistant to fluconazole, being the inhibitory halo bigger than the one presented by clotrimazole alone.

Keywords: *Calendula officinalis*, *Candida albicans*, Clotrimazole, essential oil.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se puede observar que entre las primeras causas de la consulta ginecológica se encuentran el prurito vaginal y la leucorrea, que están íntimamente relacionadas con las infecciones vaginales, por ello es importante que a las pacientes se les pueda brindar un diagnóstico oportuno y tratamiento eficaz para poder evitar y/o disminuir la incidencia de recidivas; las cuales afectan la calidad de vida, pero también, unido a otros factores, podrían ocasionar la mutación de los microorganismos generando resistencia al tratamiento convencional, obligando al médico a elegir otras opciones terapéuticas.¹

Candida albicans es un microorganismo que está presente como parte del medio normal en la vagina y generalmente se comporta como inofensivo, y varía en su cantidad dependiendo de la edad reproductiva de las mujeres sanas. Pero cuando existe una alteración de la homeostasis del medio, como disminución transitoria de la inmunidad vaginal, empieza a proliferar esta levadura, sufriendo un cambio morfogénico más invasivo, produciendo síntomas clínicos como inflamación, disuria, leucorrea, prurito, entre otros.²

Más de 370 millones de mujeres en algún periodo de su vida experimentarán candidiasis vulvovaginal recurrente.³ No obstante, esta patología es a menudo minimizada como clínicamente insignificante, lo que conlleva a que no se investiguen nuevos tratamientos, como también a no ser notificada, por lo que no se conoce realmente la incidencia.

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es un problema de salud que aflige a alrededor del 70 a 75% de las féminas en edad reproductiva, y se considera que el 40 y 50% experimentará recurrencia. Al identificar al tipo específico de *Candida*, se encuentra que entre el 85 a 95% de las levaduras aisladas se encuentra a *Candida albicans*, y en segundo lugar encontramos a *Candida glabrata* con 10 a 20%.⁴

En el Perú, no existen cifras actuales nacionales de la incidencia y prevalencia de CVV, aunque en estudios de años muy anteriores, en un artículo elaborado en 1998, en el Hospital Arzobispo Loayza, se publicó la estadística en cuanto a infecciones vaginales

de dicho hospital, refiriendo que fue la Vaginosis bacteriana (VB) la patología infecciosa vaginal más usual con 23,24%, seguida de Candidiasis vaginal con 16,2%.⁵

Por otro lado, en un estudio publicado en el 2016, efectuado en el puesto de salud de Chiclayo, determinó la prevalencia de vaginitis y VB con pacientes gestantes y también mujeres en edad reproductiva, resultando que a través de los años, la VB sigue siendo la infección vaginal más frecuente con 66,6%, continuado de hifas micóticas con 22,2%.⁶

Al ser la VB y la CVV una realidad latente en nuestro país, el Ministerio de Salud a través de su Guía Nacional de manejo de ITS, propone tratamientos sindrómicos, dentro de ellos, el síndrome de flujo vaginal, el cual debe incluir un fármaco que tenga actividad para VB, Tricomoniasis y CVV dentro de la primera consulta⁷

El Perú es un país rico en cuanto a su diversidad en flora y fauna, es por tal, que las personas aún realizan prácticas tradicionales curativas utilizando los conocimientos hereditarios de sus ancestros sobre la usanza de plantas medicinales. Por tal, es importante darle un refuerzo y contrastación científica al uso de la flora que podemos encontrar en nuestro país, y así poder emitir recomendaciones acerca de su uso y efectividad.

La *Calendula officinalis* es una planta que usualmente se usa en dermatología, hay diversos estudios de fitofármacos que avalan su uso, especialmente en el tratamiento de forma tópica. Pero también tiene otros usos, se usa como colorante, su aceite en la elaboración de perfumes y demás. Además, se han identificado un efecto antibiótico y antifúngico a través de su extracto acuoso y/o aceite esencial.⁸

Según diversos estudios, como el artículo de revisión de Lastra y Piquet⁹, nos revelan las propiedades farmacológicas de la *Calendula officinalis*, centradas en el amplio espectro de componentes químicos que presentan sus flores, lo cual guarda estrecha relación con los efectos farmacológicas de la planta. Dentro de estos compuestos, encontramos principalmente a los carotenoides, flavonoides y triterpenos, entre otros.

Se han encontrado algunos trabajos de investigación previos, que describen las diversas propiedades de la *Calendula officinalis*, los cuales abarcan una gran cantidad de efectos.

Por todo lo antes planteado, se expone el siguiente problema: ¿El aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol a 50ug tienen efecto sinérgico antifúngico sobre *Candida albicans* resistente a Fluconazol, in vitro?

La aparición de cepas resistentes al tratamiento convencional, tal como a otros antimicóticos es alarmante, es por ello que a través de la investigación se debe generar nuevo conocimiento necesario para abordar este problema de salud, y así buscar nuevas opciones terapéuticas que sean eficaces y seguras que procedan de fuentes naturales, teniendo en cuenta que nuestro país tiene una flora diversa y una población llena de conocimiento ancestral, el cual, se debe contrastar a través del método científico y así aprovechar los principios activos encontrados en las plantas para poder utilizarlos en la creación de nuevos medicamentos. Es por tal motivo que se pretende realizar la presente investigación, para el estudio de nuevas alternativas terapéuticas entre ellas, el uso de *Calendula officinalis*.

La hipótesis de investigación fue que el aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol a 50ug tienen efecto sinérgico antifúngico sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

Se plantearon el siguiente el objetivo, determinar el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol a 50ug sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol. Y dentro de los objetivos específicos: Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol, evaluar el efecto antifúngico de Clotrimazol a 50 ug sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol, y evaluar el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol a 50ug sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

II. MARCO TEÓRICO

Pazhohideh Z. et al¹⁰ (Irán, 2018) pusieron a prueba la acción del aceite esencial de *Calendula officinalis* versus el Metronidazol en la vaginosis bacteriana en mujeres. Evidenciaron que antes de la intervención, los dos grupos no diferían significativamente con respecto al ardor vaginal, el olor, la disuria y la dispareunia, pero la picazón era significativamente más común en el grupo de *C. officinalis* que en el grupo de metronidazol. Una semana después de la intervención, todas las mujeres en ambos grupos estaban libres de síntomas, incluyendo picazón vaginal y sensación de ardor, olor, disuria y dispareunia.

Torres G. et al¹¹ (Colombia, 2017) estudiaron el beneficio o la cantidad extraída de aceite esencial de *Calendula officinalis* adquirido por destilación mediante gas de agua asistida por calentamiento Oómhico (OAHD) y por la hidrodestilación (HD). Los resultados evidenciaron divergencias significativas al confrontar el período total de extracción y el beneficio en cuanto a la cantidad de material extraído (%v/w) en relación de la técnica de extracción y la conservación de la flor. Fueron superiores los efectos que se mostraron con la técnica de extracción OAHD.

Saffari E. et al² (Irán, 2016) compararon el efecto de *Calendula officinalis* versus Clotrimazol en VVC mediante un estudio controlado aleatorio. En este ensayo triple ciego examinaron el efecto de un preparado en forma de crema vaginal a base de esta planta. Se concluyó que la crema vaginal de caléndula fue eficaz en la cura de la VVC y parece tener un efecto más prolongado en el tiempo en balance con la crema vaginal a base de Clotrimazol.

Mogrovejo A.¹⁴ (Perú, 2014) valoró la característica cicatrizante a partir de un gel elaborado con *Calendula officinalis* in vivo (en ratas). Elaboró geles al 5% y 10% colocándolos en 16 ratas, las cuales se les hizo dos incisiones de 1cm de largo cada una. Se comparó los geles en ambas presentaciones, con uno de marca Cicatricure®. Se concluyó que el gel que estaba hecho en base a *Calendula officinalis* al 10% no mostraba diferencias significativas en comparación con el preparado comercial de Cicatricure®, sin embargo, si se obtuvieron diferencias con el del al 5%, por tal, se

pudo inferir que el gel al 10% se puede utilizar en el tratamiento cicatrizante de heridas superficiales.

Milián V. et al¹² (Chile, 2010) evaluaron la acción de una tintura a base de *Calendula officinalis* en el tratamiento local de VVC recurrente. Tras aplicar el estudio a 46 mujeres aleatoriamente, pudieron verificar que hubo una disminución en la cantidad de mujeres con estudio microbiológico positivo (16.7%) a los 21 días. Por tal, concluyeron que la *Calendula officinalis* también presenta efecto antifúngico contra *Candida albicans*, siendo que representa una opción a investigar para la cura de esta patología.

Gazim Z. et al¹³ (Brasil, 2008) valoraron la acción antifúngica del aceite esencial de *Calendula officinalis* mediante la difusión en discos, con plantas que habían sembrado y cultivado en Brasil, probando que sí se tuvo actividad in vitro del aceite esencial frente a 23 cepas de hongos clínicos analizados, dentro de ellos, distintas especies de *Candida*.

Calendula officinalis proviene de la familia de las asteráceas, es una especie oriunda de Egipto, pero que ahora se encuentra en los jardines todo el mundo, ya que aparte de sus diversas propiedades antimicrobianas y antifúngicas, es una planta ornamental.⁸ Varía de ser anual a perenne, y que ahora se cultiva en el mundo entero. Es una planta herbácea, glandular, aromática y de la cual se han descrito muchas propiedades medicinales.¹⁵

En diferentes partes del planeta, tiene diferentes nombres, pudiendo ser llamada “caléndula”, “mercadela”, “botón de oro”, “maravilla”, “flor de muerto”, “Marygold”. Este último nombre lo utilizan en Norteamérica, y esto se forma en base a una leyenda derivada de la edad media, en la cual asocian a María, la virgen, con las características flores doradas de esta planta.¹⁶

En cuanto a su caracterización botánica, la *Calendula officinalis* se describe como una planta anual, de tallo robusto, que mide de 40 a 60 cm de altura aproximadamente. Sus flores se presentan en cabezuelas solitarias terminales de unos 5cm de ancho con flores tubulosas en el disco. Generalmente son de color amarillo anaranjado a

anaranjado. Las partes a utilizar de esta planta son las inflorescencias, también llamadas flores, y también los flósculos aislados, conocidos comúnmente como pétalos.⁸

En cuanto a la ecología, la *Calendula officinalis* es un hemicriptófito que crece en un ambiente templado, pero muy adaptable, que puede resistir a temperaturas muy bajas, e incluso se adapta a temporadas de sequías, lo que puede explicar el porqué de su resistencia y perdurabilidad a través de los años, como también, de que se haya extendido por todo el mundo, adaptándose a los diversos climas de diversos países.¹⁷

En cuanto a la conservación de la planta para su posterior utilización como planta medicinal, múltiples referencias explican la importancia de la técnica de secado. Este debe ser inmediato tras su colecta, ya al ser almacenada de 3 a 5 horas en sacos de polietileno, esta planta va a perder hasta el 30% de sus carotenoides y hasta el 26% de sus flavonoides. Para su secado, se recomienda una temperatura de 80°C, ya que a esta temperatura se obtiene un mayor rendimiento de carotenoides, y esto se puede explicar al menor tiempo de secado, que se traduce en una menor actuación de enzimas.⁹

Se conoce que las flores de la *Calendula officinalis* está compuesta por saponósidos triterpénicos, flavonoides, especialmente monodesmósidos y bidesmósidos del ácido oleanílico, polisacáridos, alcoholes triperpénicos esterificados y libres, esteroides, carotenoides y aceite esencial rico en derivados sesquiterpénicos oxigenados.¹⁷

La acción farmacológica de la *Calendula officinalis* es amplia. Esta planta puede actuar como antiinflamatoria, cicatrizante, antibacteriana, antifúngica, e incluso se ha publicado diversas referencias en las que se evalúa el efecto antitumoral del aceite de esta planta. En cuanto a estudios específicos, se evaluó el efecto bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y antifúngica frente a diversas hifas micóticas. Se ha postulado que las sustancias que podrían componer los principios activos de la droga son las xantofilas y el aceite esencial.^{17, 18}

En cuanto a las advertencias y precauciones, el uso tópico de algún derivado de la planta, va a estar contraindicado en personas que presenten alergia o sensibilidad a

las Asteráceas. En estudios experimentales realizados, se ha evidenciado una leve sensibilización de la piel, pero esto nunca evolucionó a producir una dermatitis de contacto.¹⁷

En el cuerpo humano, hay diferentes bacterias y hongos que suelen ser parte de la microbiota habitual, es decir, que en homeostasis, no causan una patología. Al existir una alteración inmunológica del hospedador, sí se podría generar un proceso patológico que varían desde infecciones superficiales de la piel o mucosas, hasta infección sistémica que pueden afectar múltiples órganos. Las infecciones oportunistas más frecuentes, están producidas por *Candida albicans*, siendo este un hongo que mora comúnmente en la microbiota gastrointestinal y genital.¹⁹

Los hongos de *Candida* generalmente, se desarrollan en forma elíptica o en forma de una yema de 4 a 6 um bajo la mayor parte de ambientes y temperatura. En algunos casos, incluyendo la patología infecciosa, pueden formar hifas. Para poder identificar al género *Candida* se tiene que revisar las características morfológicas, enzimáticas y bioquímicas; por ejemplo el metabolismo de glúcidos, potencial de fermentación y la potencia de producción de tubos germinales, hifas y clamidoconidias. El género *Candida* cuenta con más de 150 especies, de las cuales, menos de 10 son realmente causante de alguna patología en humanos. Es importante poder realizar la determinación etiológica microbiológica de *Candida albicans* con respecto de otras especies, ya que esta es la causa más común de enfermedad.¹⁹

El medio de cultivo de del género *Candida* es el agar Sabouraud, ya que en este, crecen con rapidez, pero también se podría utilizar medios de cultivo enriquecidos, como el agar sangre. En este último, se cultiva la *Candida* y tras una noche de incubación, se generan colonias llanas, blancuzcas, de 2 a 4mm, afines a las generadas por los estafilococos. La ventilación de los cultivos beneficia su cultivo. Para poder identificar a *Candida albicans* de otras especies se debe realizar la prueba de tubo germinal, que consiste en la identificación bioquímica de la especie.¹⁹

En cuanto a la pared celular de *Candida albicans* consta de una mixtura de glucanos, polisacáridos de quitina y manano, sola o fusionados con proteínas. Presenta una

cubierta exterior fibrilar que se ocupa a partir la superficie y comprende diversas glicoproteínas llamadas manoproteínas, las cuales tienden a modificar la estructura de la pared celular según el contexto de crecimiento.¹⁹

En cuanto al tratamiento farmacológico, por lo general, *Candida albicans* es susceptible a caspofungina, nistatina, anfotericina B, flucitosina, y sustancias azólicas.¹⁹ En el Perú, la norma técnica de infecciones genitales, indica que el tratamiento específico ante la sospecha de Vulvovaginitis candidiásica, es la aplicación vaginal de Clotrimazol de 500mg durante una semana.⁷

Los antifúngicos azólicos abarcan 2 clases agrupadas: los imidazoles y los triazoles. Uno y otro presentan el equivalente mecanismo y espectro de acción frente a los hongos. Los triazoles se metabolizan con menor velocidad y poseen menos efecto en la creación de esteroides en los humanos, en comparación con los imidazoles. Dentro de los triazoles más representativos encontramos a terconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol. Por otro lado, dentro de los imidazoles están el miconazol, clotrimazol, cetoconazol, oxiconazol, sertaconazol, y otros.²⁰

El mecanismo de acción de los imidazoles y triazoles se fundamenta en el bloqueo de la acción de la enzima desmetilasa 14- α -esterol, la cual es parte del citocromo P450. En este sentido, dificultan la formación de ergosterol en la membrana plasmática y facilitan el depósito de los 14- α -metilesteroides. Los metilesteroides afectan la unión angosta de las sucesiones acilo de fosfolípidos y, por consiguiente, cambian las funciones de algunas enzimas de la membrana, como la ATPasa y otras enzimas involucradas en el sistema de transporte electrónico, inhibiendo así el crecimiento y desarrollo de los hongos. Pero, específicamente el clotrimazol aumenta específicamente la porosidad de la membrana plasmática de esta levadura, pero las concentraciones específicas para ese fin quizá se logren sólo con el uso local.²⁰

III. METODOLOGÍA

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO: Aplicado²²

DISEÑO: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba²²

Representado de la siguiente manera:

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG ₃	X ₃	O ₃
RG ₄	X ₄	O ₄

En dónde:

RG₁₋₄: Cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol.

X₁: Clotrimazol 50ug + aceite esencial de *Calendula officinalis*

X₂: Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%

X₃: Clotrimazol 50 ug

X₄: Solución salina fisiológica

O₁₋₄: Efecto antifúngico

3.2 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

3.2.1 VARIABLES:

3.2.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antifúngico

-Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%.

-Clotrimazol a 50ug.

3.2.1 .2 VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antifúngico:

- Efectivo
- No efectivo

3.2.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: (ANEXO 1)

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN:

La población estuvo compuesta por las cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol.

TAMAÑO DE MUESTRA: Se realizaron 10 repeticiones (ANEXO 3)

Unidad de análisis: Cada colonia de cepas de *Candida albicans* resistente a fluconazol cultivada en la placa Petri.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas con cultivos de *Candida albicans* resistente a fluconazol puros.
- Placas cultivadas en 24 horas.

Criterios de exclusión:

- Placas contaminadas.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

-TÉCNICA:

Se realizó la observación del desarrollo fúngico de *Candida albicans* resistente a fluconazol en las placas Petri, las cuales se expusieron a clotrimazol 50ug; y/o: aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%, y los resultados del experimento fueron registrados.

-INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

Se efectuó en una matriz de doble entrada elaborada por la investigadora, en donde, se anotó el número de muestra y el halo de inhibición obtenido, de acuerdo a la sustancia a la que fue sometido. (ANEXO2).

-VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO:

No se requiere para este tipo de estudio.

3.5 PROCEDIMIENTO

Se solicitó el acceso al laboratorio “San José” (ANEXO 4). Se realizó la compra de aceite esencial de *Calendula officinalis* ya que debido al contexto actual de pandemia, los herbarios de las universidades locales no se encuentran funcionando, lo cual dificultó la certificación de la planta a utilizar para obtener el aceite esencial, por lo que se decidió comprar directamente el aceite esencial de *Calendula officinalis* del laboratorio Ekala®. Se nos brindó el certificado de pureza del aceite. (ANEXO 5). La cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol fue adquirida de un laboratorio que la tuvo previamente aislada y conservada en óptimas condiciones. Se cumplieron con las normas de bioseguridad según el manual de la OMS.²⁷ Se preparó el Agar Saboraud, que es el medio de cultivo, en las placas Petri. Luego se procedió a hacer el inóculo, siendo que en un tubo de

ensayo se vertió 3ml de solución salina fisiológica, para luego agregar la cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol, logrando una turbidez y suspensión de 0.5 escala de Mc Farland. Posteriormente se procedió a ser sembrado en las placas. La preparación del papel filtro se realizó incorporando los antifúngicos a estudiar, los cuales se introdujeron en las placas que habían sido sembradas con la cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol. Luego se procedió a introducir las placas en un horno a 33-37°C por 48 horas. Luego de este tiempo se hizo la medición de halos.

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Se recurrió a la estadística descriptiva para el análisis de la data recogida, utilizando medidas de tendencia central, con el propósito de describir el halo de inhibición en cada uno de los tratamientos. También se aplicó estadística inferencial para comprobar hipótesis, se usó ANOVA para evaluar si existían divergencias significativas en cuanto a las medias y las varianzas de los halos de inhibición de los tratamientos. La prueba post hoc (prueba de Tukey) permitió identificar el mejor tratamiento comparando los grupos estudiados. Se utilizó SPSS versión 25.0

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Se presentaron los resultados de forma fidedigna y sin alteración.²⁸ Se cuenta con el certificado de pureza del aceite esencial (ANEXO 6). La investigadora y sus asesores declaran no tener conflicto de intereses.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

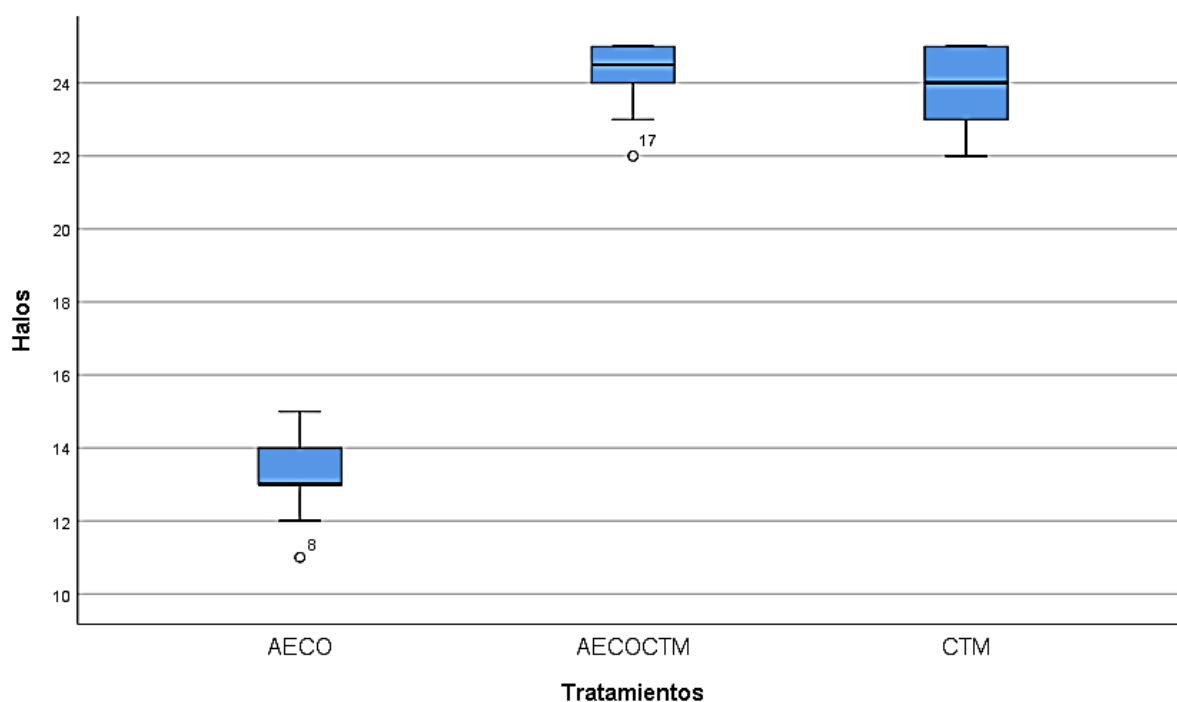
TABLA 1. DESCRIPCIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis* al 100%, SOLO Y EN SINERGIA CON CLOTRIMAZOL A 50ug, Y CLOTRIMAZOL A 50ug CONTRA *Candida albicans* RESISTENTE A FLUCONAZOL, IN VITRO.

Grupos de estudio	N	Zonas de inhibición (mm)						
		MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR	95% IC		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i>	10	13,30	1,252	,396	12,40	14,20	11	15
Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> + Clotrimazol	10	24,20	1,033	,327	23,46	24,94	22	25
Clotrimazol 50 ug	10	23,90	,994	,314	23,19	24,61	22	25

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

Se encontró que la media de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Calendula officinalis* fue $13,3 \pm 1,25$ mm, valor por debajo de la media del Clotrimazol ($23,9 \pm 0,99$ mm). En sinergia (Aceite esencial de *Calendula officinalis* + Clotrimazol) la media fue de $24,2 \pm 1,03$ mm.

FIGURA 1. EFECTO ANTIFÚNGICO DE ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis* AL 100%, COMBINACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis* AL 100%, Y CLOTRIMAZOL A 50ug; Y CLOTRIMAZOL A 50ug.



FUENTE: Tabla 01.

Donde:

- **AECO:** Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%
- **AECOCTM:** Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% + Clotrimazol 50 ug
- **CTM:** Clotrimazol 50 ug

La combinación del aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol consiguió efecto antimicótico ligeramente superior al efecto dado por el Clotrimazol (halos de inhibición de $24,2 \pm 1,03\text{mm}$ y $23,9 \pm 0,99\text{ mm}$, respectivamente).

TABLA 2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LAS MEDIAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN GENERADO POR EL ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis*, *Calendula officinalis* + CLOTRIMAZOL Y CLOTRIMAZOL.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	770,867	2	385,433	319,224	,000
Dentro de grupos	32,600	27	1,207		
Total	803,467	29			

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

Se encontró que hay diferencia significativa ($p=0.000$) entre los promedios de las zonas de inhibición producidas por grupos evaluados.

TABLA 3. PRUEBA DE TUKEY QUE COMPARA LOS EFECTOS ANTIFÚNGICOS DE ACEITE ESENCIAL DE *Calendula officinalis* al 100%, *Calendula officinalis* al 100% + CLOTRIMAZOL A 50ug y CLOTRIMAZOL A 50ug.

Grupos de estudio	N	Zona de inhibición		
		Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i>	10	13,30		
Clotrimazol 50 ug	10		23,90	
Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> + Clotrimazol	10			24,20

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

La combinación del aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol tuvo el mejor efecto antifúngico con 24,20mm.

DISCUSIÓN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una patología de continua presencia a nivel mundial, y el Perú no se encuentra alejado de esta realidad. Al ser la CVV una patología subdiagnosticada, hace que las pacientes no sean tratadas oportunamente, lo cual afecta la calidad de vida de quienes presentan esta patología, y también puede condicionar la resistencia del agente patógeno.^{4, 5}

El Perú es un país que posee una gran diversidad biológica, y además cuenta con diversas condiciones climatológicas que permiten la adaptación y crecimiento de variedades botánicas provenientes de otros países.³⁰ Además, las prácticas milenarias de Medicina tradicional se mantienen vigentes en diferentes regiones de este país, por tal, surge la necesidad de brindarle respaldo científico a este conocimiento empírico y así poder conducir estas prácticas de forma segura y beneficiosa para la población.

Calendula officinalis es una planta muy usada en medicina tradicional por los diversos efectos que tiene y que ya han sido estudiados, como efecto antimicrobiano, antiviral y cicatrizante. También se ha descrito su uso en vaginosis bacteriana y vulvovaginitis candidiásica.^{2,10,12} En estos estudios se encontraron efectos beneficiosos al aplicar un tratamiento a base de *Calendula officinalis* sobre las pacientes estudiadas. Pero el efecto aún es poco estudiado en cepas con algún tipo de resistencia farmacológica, por lo que se incluyó en esta investigación, cuyo como objetivo fue determinar el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%, la combinación del aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% y Clotrimazol a 50ug, y Clotrimazol a 50ug, contra *Candida albicans* resistente a fluconazol, en estudio in vitro.

En la Tabla 1 se observa que la zona inhibitoria que produjo el aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% solo es de $13,30 \pm 1,25$ mm, con lo cual se evidencia que no presentó actividad antifúngica, ya que las zonas de inhibición fueron inferiores al

mínimo establecido por el CLSI, que es 20mm para considerar eficaz el efecto de un medicamento contra esta levadura.²³ Este resultado es inferior en comparación al estudio de Gazim Z. et al¹³ (Brasil, 2008), en el que evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Calendula officinalis* sobre distintas cepas de *Candida*, dentro de las cuales, 3 cepas de *Candida albicans* obtenidas de muestras de pacientes con candidiasis vulvovaginal, se obtuvieron halos de inhibición de 18mm, 15mm y 15mm respectivamente. La diferencia en los resultados de estos estudios podría deberse a la cepas utilizadas y al tipo de estudio, ya que como se puede observar, en el estudio citado, las cepas de *Candida albicans* fueron extraídas de muestras en fresco, y no presentaban resistencia a algún fármaco.

Es importante mencionar que, debido al contexto de pandemia, se tuvo que comprar el aceite esencial de *Calendula officinalis* con el respectivo certificado de pureza. Además de los factores antes mencionados, también podríamos atribuir el contraste de resultados, comparados con los estudios previos, en la diferencia en cuanto a la obtención del aceite, los cuidados que se le brindaron al procesamiento de la obtención del aceite esencial e incluso la diferencia en cuanto a las características del sembrado de la planta, ya sea el clima, la calidad de la tierra u otros factores ambientales.

El aceite esencial de *Calendula officinalis* es una mezcla de compuestos volátiles, dentro de ellos, flavonoides, saponósidos triterpenos, esteroides y carotenoides. Este aceite esencial es rico en derivados de sesquiterénicos oxigenados, los cuales, unidos a los flavonoides, tienen una gran acción antiinflamatoria local. El mecanismo de acción frente a *Candida albicans* es la inhibición de la síntesis de ergosterol y la interrupción de la integridad de la membrana.⁹

De otro lado, el efecto del Clotrimazol a 50ug (control positivo) presentó una zona de inhibición de $23,90 \pm 0,99$ mm, lo cual nos indica que fue efectivo frente al patógeno en

estudio. En este punto es importante explicar el porqué de la efectividad del Clotrimazol frente a una especie de *Candida albicans* resistente a Fluconazol.

Tapia C³¹ (Chile, 2012) y Branco J., et al³² (Portugal, 2017) describen los mecanismos de resistencia antimicótica primaria y secundaria dependientes de las mutaciones que va sufriendo la levadura, siendo que éstos dependen de las características propias o adquiridas de los patógenos fúngicos. En los factores intrínsecos se describen una serie de mutaciones genéticas que se expresarían en el cambio de receptores y bombas de membrana necesarias para el ingreso de los azoles al espacio intracelular y que puedan inhibir la síntesis del ergosterol. Empero, existen otros mecanismos de acción que los diferentes azoles pueden tener. Estos mecanismos se relacionan con la acumulación de peróxido de hidrógeno secundario a la alteración de los mecanismos enzimáticos que intervienen en su síntesis y desoxificación, lo cual produciría un depósito capaz de dañar las organelas intracelulares, produciendo la muerte de la levadura.³³ Es así que, si bien, los derivados azólicos tienen el mismo mecanismo de acción al inhibir la 14- α metilasa, pueden tener otros mecanismos de acción secundarios, lo cual explicaría la susceptibilidad a fármacos de la misma familia.

Existen reportes de *Candida albicans* resistente a fluconazol con susceptibilidad a otros azoles como el clotrimazol, como el estudio realizado por Marchaim D. et al³⁴ (EEUU, 2012) donde se identificaron a 25 pacientes con CVV con resistencia a fluconazol, pero dentro de los hallazgos encontraron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del Clotrimazol aplicado a este tipo de *Candida albicans* resistente a fluconazol era en promedio 0.13 microgramos/mL. Entendiéndose que, mientras la CMI sea más baja, la zona de inhibición que producirá este fármaco, será más grande.³⁵

En cuanto a la combinación de aceite esencial de *Calendula officinalis* y Clotrimazol 50ug, este mostró la zona de inhibición más alta, siendo de $24,20 \pm 1,033$ mm,

evidenciando que existe una sinergia al combinar estos compuestos. Si bien no existen estudios previos que abarquen las características de este estudio en cuanto a la cepa de *Candida albicans* y la combinación del aceite esencial de *Calendula officinalis* y clotrimazol, estos resultados nos hacen dar cuenta de que existen alternativas farmacológicas de tipo natural, eficiente y al alcance de la población, la cual podría resultar beneficiada al iniciar este tratamiento, que debe seguir siendo estudiada para continuar las fases para el desarrollo de nuevos medicamentos para asegurar la seguridad de su uso en humanos.

Para culminar, podemos decir que, el aceite esencial de *Calendula officinalis* tiene potencial como agente antifúngico, el cual debe explorarse, ya que como se demostró en esta investigación sí presentó sinergia con el clotrimazol frente a *Candida albicans* resistente a fluconazol.

V. CONCLUSIONES

La combinación del aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% y Clotrimazol a 50ug presentan efecto sinérgico antifúngico sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

El aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% no tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

El clotrimazol a 50ug tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios in vitro con el fin de evaluar el efecto del aceite esencial de *Calendula officinalis* obtenido en combinación con otros antifúngicos para comprobar la existencia de sinergia con el fármaco.
- Se invita a desarrollar estudios comparando el efecto del aceite esencial de *Calendula officinalis* obtenida por arrastre a vapor en laboratorio, para evaluar si existe diferencia en la eficacia antifúngica.
- Se recomienda ejecutar estudios en animales con el propósito de valorar la efectividad y toxicidad del aceite esencial de *Calendula officinalis*, así como la dosis terapéutica idónea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abril M. Infecciones vaginales y factores de riesgo relacionados en pacientes atendidas en el área de ginecología del centro de especialidades central Cuenca (IESS), 2016 [Tesis]. Cuenca, México: Universidad de Cuenca. 2017 [citado 22/07/2019] Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28462/1/Tesis.pdf>
2. Saffari E, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Adibpour M, Mirghafourvand M, Javadzadeh Y. Comparing the Effects of Calendula Officinalis and Clotrimazole on Vaginal Candidiasis: A Randomized Controlled Trial. *Women & Health* 57(10), [Internet]. 2016 Nov [citado 22/07/2019]. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03630242.2016.1263272>
3. Fukazawa E, Witkin S, Robial R, Vinagre J, Baracat E, et al. Influence of recurrent vulvovaginal candidiasis on quality of life issues. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2019. [Citado 22/07/2019]; 300: 647-650.
Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05228-3>
4. Tapia P.C. Candidiasis vulvovaginal. *Rev Chil Infectol* [Internet]. 2008 Ago [citado 2019 Jul 23]; 25(4): 312-312. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016&lng=es.
5. Medina R, Rechkemmer A, Garcia-Hjarles M. Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en pacientes con flujo vaginal anormal en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Rev Med Hered* [Internet]. 1999 Oct [citado 2019 Jul 23]; 10(4): 144-150. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X1999000400005&lng=es.
6. Pérez O, Vásquez Y. Vaginitis y vaginosis bacteriana en mujeres en edad fértil y gestantes en un centro de salud de la provincia de Chiclayo. *Rev Sal & Vida Sipanense* [Internet]. 2016 [citado 2019 Jul 23]; 3(2): 37-42. Disponible en:
<http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/427/414>

7. Ministerio de Salud del Perú. Guía nacional de manejo de infecciones de transmisión sexual. Lima – Perú. 2006.
8. Moore T, Sánchez L, Desmarchelier C. Manual de cultivo y manejo de Caléndula. Asociación Argentina de Fitomedicina. [Internet] [Citado 2019 Jul 24]. Disponible en:
http://fitomedicina.org/old/archivos/manual_de_cultivo_para_calendula_officinalis.pdf
9. Lastra Valdés H, Piquet García R. Calendula officinalis. Rev Cubana Farm [Internet]. 1999 Dic [citado 2019 Jul 24]; 33(3): 188-194. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151999000300007&lng=es.
10. Pazhohideh Z, Mohammadi S, Bahrami N, Mojab F, Abedi P, Maraghi E. The effect of Calendula officinalis versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. J Adv Pharm Technol Res. [Internet]. 2018; [cited 2019 Aug 06]; 9 (1): 15-19. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29441319>
11. Torres G, Sarmiento O, Guevara O. Evaluación del rendimiento del aceite esencial de caléndula (*Calendula officinalis* L) obtenido por OAHD. *Revista ION* [Internet]. Jun 2018, [cited 2019 Aug 07]; 31 (1), 13-19. Disponible en:
<https://dx.doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018002>
12. Milián V, Seife R, Morales O, Vásquez M, Martín A, Quiros M. Calendula officinalis en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas ISSN: 0717-7917. [Internet]. 2010 Mar [Citado 2019 Agos 02]; 9(5): 343-352. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/856/85615225005/1>
13. Gazim Z, Rezende C, Fraga S, Svidzinski T, Cortez D. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. Braz. J Microbiol. [Internet]. 2008 Mar [cited 2019 Aug 02];39(1):61-63. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000100015&lng=en.

14. Mogrovejo Valdivia A. Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Calendula officinalis* (caléndula) en animales de experimentación. [Internet]. 2014. [citado 2019 Agos 02]. Disponible en <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/4409/65.1504.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Wikipedia [Internet]. [Citado 2019 Agos 12]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Calendula_officinalis
16. Acosta de la Luz L, Rodríguez F, Sánchez G. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2001 Abr [citado 2019 Ago 14]; 6(1): 23-27. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962001000100006&lng=es.
17. Muñoz Centeno L. Plantas medicinales españolas: *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Rev Medicina Naturista [Internet] 2004 [citado 2019 Ago 14]; 5: 257-261. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2050731.pdf>
18. Szakiel A, Ruszkowski D, Grudniak A, Kurek A, Wolska KI, Doligalska M, Janiszowska W. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). [Internet]. 2008 Nov [citado 2019 Ago 14] 74(14): 1709 – 15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951335>
19. Ryan K, Ray G, Ahmad N, Drew M, Lawrence W, Lagunoff M, et al. Sherris Microbiología clínica. Quinta edición. Editorial Mc Graw Hill. EUA. 2011.
20. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Editorial Mc Graw Hill. EUA. 2007.
21. Pfaller M. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clinical Microbiology Reviews. [Internet] 2007; [citado 2019 Set 10] 133-163. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223626>
22. Sampiere, Hernández C, Baptistista P. Metodología de la investigación. 6ta ed. Ed McGrawHill. México. 2016.
23. CLSI. Susceptibility testing of yeasts. [Internet] 2011. [citado 2019 Set 10]. Disponible en: <http://www.rosco.dk/gfx/pdf/yeasts.pdf>

24. García J, Reding A, López J. Cálculo de la muestra en educación médica – Investigación en Educación Médica. 2013, 2(8) pp222 [citado 2019 Set 10] Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/iem/v2n8/v2n8a7.pdf>
25. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3° ed. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2_004_11SP.pdf
26. Salomón S, López O, García M, González M, Fusté V. Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de hojas de Morinda citrifolia L. (noni). Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2009 Jun [citado 2019 Oct 16] 14(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000200003&lng=es.
27. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. Ginebra. 2005.
28. Colegio Médico del Perú. Código de ética y deontología. Perú. Disponible en: <https://www.cmp.org.pe/wp-content/uploads/2019/01/CODIGO-DE-ETICA-Y-DEONTOLOG%C3%8DA.pdf>
29. Servicio nacional de aprendizaje (SENA). Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Ed Servicio nacional de aprendizaje (SENA). Colombia. 2006. Disponible en: https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/#
30. Ministerio del ambiente del Perú. Sexto informe nacional de biodiversidad biológica. Lima. 2019. Disponible en: [https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/360831/La Biodiversidad en Cifras_final.pdf](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/360831/La_Biodiversidad_en_Cifras_final.pdf)
31. Tapia C. Antifúngicos y resistencia. Rev Chil Infectol. 2012;29(3):357-357. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300020>
32. Branco J, Ola M, Silva RM, Fonseca E, Gomes NC, Martins-Cruz C, et al. Impact of ERG3 mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and

NDT80 in *Candida parapsilosis* azole resistance. Clin Microbiol Infect. 2017;23(8):575.e1-575.e8.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.02.002>

33. Cárdenas L. Pérez J. Mecanismos de resistencia a Fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo, 2020, vol. 22, ISSN: 0124-2059 / 2027-128X.

Disponible en:

[https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/IE/22%20\(2020\)/145263339011/145263339011_visor_jats.pdf](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/IE/22%20(2020)/145263339011/145263339011_visor_jats.pdf)

34. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. Obstet Gynecol. 2012 Dec;120(6):1407-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23168767/>

35. Cercenado Emilia. Saavedra-Lozano Jesús. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales. An Pediatr Contin. 2009;7(4):214-7.

Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-pdf-S1696281809719274>

ANEXO 1: Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
<p>V.I.: Agente antifúngico para <i>Candida albicans</i> ATCC10231</p>	<p>Cualquier sustancia que tenga la capacidad de provocar una modificación de la disposición celular de un hongo que consiga impedir su crecimiento, afectando su viabilidad o capacidad de supervivencia, ya sea de manera directa o indirecta.¹⁹</p> <p>Agente antifúngico no farmacológico: <i>Calendula officinalis</i></p> <p>Agente antifúngico farmacológico: Clotrimazol</p> <p>Agente antifúngico sinérgico: Extracto acuoso de <i>Calendula officinalis</i> asociado a Clotrimazol a la concentración de 50ug</p>	<p>La población estará conformada por los siguientes grupos:</p> <p>1. Clotrimazol 50ug + aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i>.</p> <p>2 .Extracto acuoso de <i>Calendula officinalis</i>.</p> <p>3. Clotrimazol 50ug</p> <p>4. Solución salina fisiológica.</p>	<p>RG₁</p> <p>RG₂</p> <p>RG₃</p> <p>RG₄</p>	<p>Cualitativa</p>
<p>V.D.: Efecto sinérgico antifúngico</p>	<p>Se refiere a la interacción medicamentosa entre 2 o más agentes que produce un efecto antifúngico que es superior en comparación al aditamento de los efectos de los agentes individuales.²¹</p>	<p>Se determinará el efecto sinérgico antifúngico con el halo de inhibición²³:</p> <p>No efectivo</p> <p>Efectivo</p>	<p><20 mm</p> <p>≥20mm</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>

ANEXO 2
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

MUESTRAS	AECO	AECO+CTM	CTM	Agua destilada
1	13	25	23	0
2	15	24	24	0
3	14	25	24	0
4	14	25	22	0
5	12	25	25	0
6	13	24	24	0
7	15	22	23	0
8	11	23	25	0
9	13	24	25	0
10	13	25	24	0

Dónde:

- **AECO:** Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100%
- **AECO+CTM:** Aceite esencial de *Calendula officinalis* al 100% + Clotrimazol 50 ug
- **CTM:** Clotrimazol 50 ug

ANEXO 3

TAMAÑO DE MUESTRA

La elección de la muestra se estimará mediante la fórmula estadística para comparación de dos medias, según la fórmula siguiente:

$$n = \frac{\left(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta} \right)^2 2\sigma^2}{\left(\bar{X}_1 - \bar{X}_2 \right)^2}$$


n=9, pero se harán 10 repeticiones.

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1,96$ (95% confianza)
- $Z_{\beta} = 0,84$ (80% potencia)
- $X_1 = 20\text{mm}^{22}$
- $X_2 = 16\text{mm}^{13}$
- $\delta = \pm 2.8^2$

ANEXO 4


CONSTANCIA DEL LABORATORIO CLÍNICO

**San Jose**
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde KATTYA VANESSA LEÓN CABANILLAS, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Calendula officinalis* y clotrimazol sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol, in vitro", durante los días 01 al 05 de octubre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.


José Luis Catta Quevedo
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - 📠 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

ANEXO 5

CERTIFICADO ACEITE ESENCIAL



CERTIFICADO DE ANALISIS

Producto:	Aceite Esencial de Caléndula
Nombre Botánico:	<i>Calendula officinalis</i>
Lote N°:	2904-SNN-2020
Fecha de Destilación:	noviembre 2019
Fecha de Vencimiento:	noviembre 2021
Color:	Amarillo
Aroma:	Típica nota superior floral de Tagetona
País de Origen:	India
Método de Extracción:	Destilación por Arrastre de Vapor de las partes aéreas de la planta
Aceites 100% puros y naturales	

PROPIEDADES FISICO QUIMICAS RESULTADOS	ESPECIFICACION	
Gravedad específica	0.890 – 0.950	0.916
Rotación óptica	-5° a +5°	+1°
Índice de refracción	1.460 a 1.499	1.476

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444
www.ekala.ape

ANEXO 6

PROCEDIMIENTO



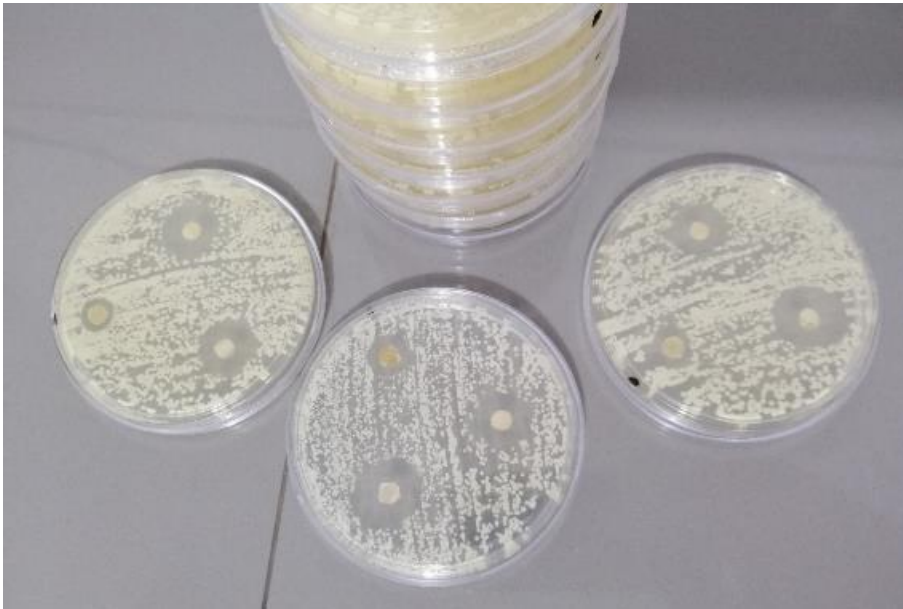
Sembrado de *Candida albicans* resistente a fluconazol en Agar Sabouraud



Elaboración de discos de sensibilidad con los diferentes antifúngicos



Colocación de discos de sensibilidad con los diferentes antifúngicos



Placas Petri al momento de la medición de los halos de inhibición